Morphologisch-biologische Studien über die Gattung *Mitrastemon* (IV)

von

KIYOHIKO WATANABE

渡邊清彥: やつこさう屬ノ形態學的並ニ生態學的研究 (其四)

X. Befruchtung, Embryo- und Endospermbildung.

Der Pollenschlauch, der 7–10 μ dick ist, trägt zwei kugelige oder elliptische Spermakerne von 6 μ Durchmesser (Fig. 29, D ; Fig. 30), und dringt durch die Mikropyle in den Embryosack ein. Das Ende des Pollenschlauchs öffnet sich in eine Synergide, und die zwei Spermakerne führen normale Doppelbefruchtung durch.

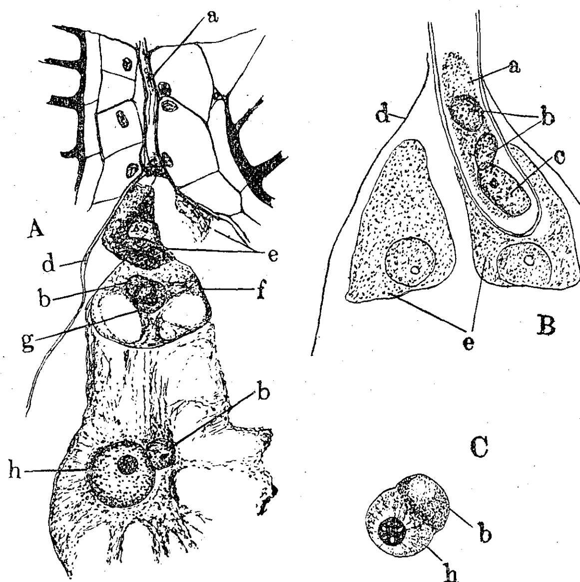


Fig. 30. Befruchtung von *M. Yamamotoi*. AB obere Hälften der Embryosäcke, C Verschmelzung von sekundärem Embryosackkern mit Spermakern. a. Pollenschlauch, b Spermakern. c Pollenschlauchkern, d Embryosack, e Synergiden, f Eizelle, g Eikern, h sekundärer Embryosackkern. (AC × 500, B × 800)

Durch den Eintritt des Spermakerns in die Eizelle verändert sich die Beschaffenheit dieser : die Zelle rundet sich ab, das Zytoplasma wird durch die Farbstoffe, z.B. Gentianaviolett besonders stark gefärbt, so dass der Spermakern bei dem Befruchtungsakt nicht leicht wahrgenommen wird.

Nach der Ver-

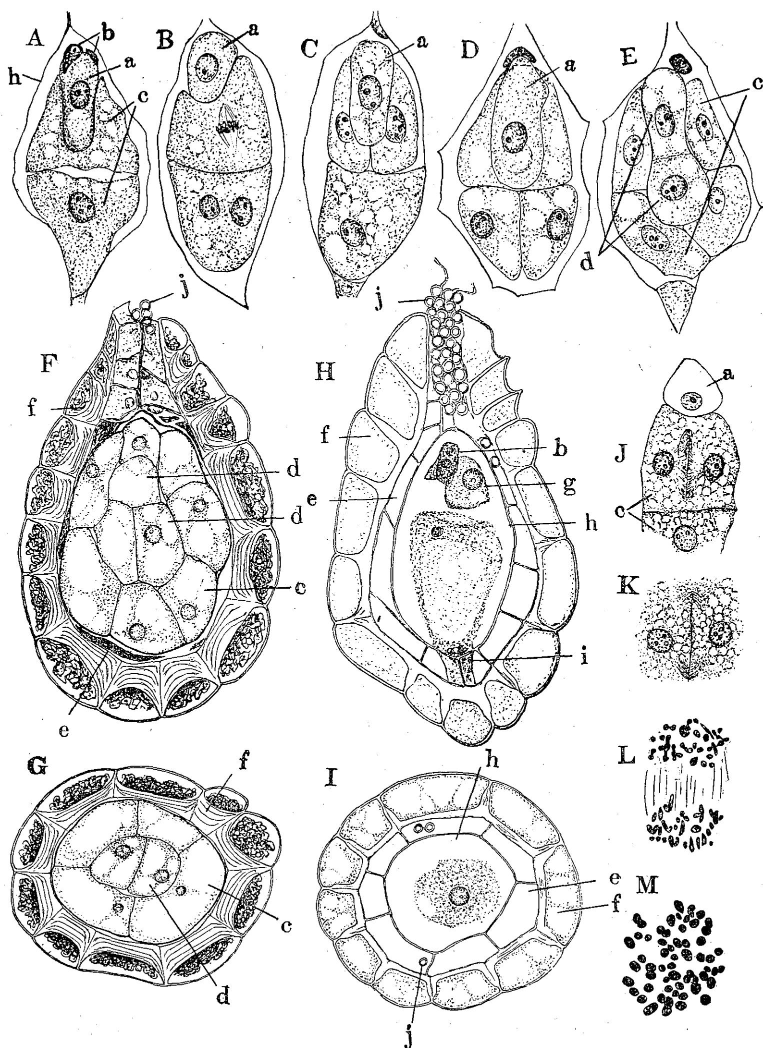


Fig. 31. Entwicklung von Samenanlage nach der Befruchtung (*M. Yamamotoi*). A–E aufeinander folgende Stadien der Embryo- und Endospermbildung, FG vervollkommnete Samen, HI steril gebliebene, samenähnlich ausgesehene Samenanlage, JK Teilung von Endospermzellen, LM Chromosomen von Endospermzellen in Teilung. (A–E, FHJK Längsschnitte; GI Querschnitte; L Seitenansicht; M Polansicht) a befruchtete Eizelle, b Synergiden, c Endospermzellen, d Embryozellen, e innere Schicht des Integuments, f Samenschale (=äussere Schicht des Integuments), g Eizelle, h Embryosack, i Antipoden, j Chlamydosporen von *Mitrastemon*-Pilz. (A–K × 230, LM × 900)

schmelzung des männlichen Kernes mit dem weiblichen verlängert sich die befruchtete Eizelle in der Längsaxe des Embryosacks und teilt sich quer in zwei, dann teilt sich die mikropylare noch einmal quer, die chalazale längs, und so entsteht ein 4-zelliger Embryo (Fig. 31, F). Ich habe recht viele Samen aus vielen Früchten genommen, aber bei keinem Fall entwickelt sich der Embryo über dieses vier-zellige Stadium hinaus.

Wie gewöhnlich vereinigt sich der sekundäre Spermakern mit dem sekundären Embryosackkern, welcher durch Vereinigung zweier Polkerne entstanden war. Nach der Einwanderung des sekundären Spermakerns gegen den sekundären Embryosackkern bemerkt man oft einen Plasmastrom, der von dem Eiapparat diesen Spermakern erreicht (Fig. 30, A).

Die Endospermbildung ist zellulär, daher teilen sich die Endospermzellen nacheinander. Die erste Scheidewand des Endosperms steht quer zur Längsaxe des Embryosacks und teilt diesen in zwei gleiche Hälften, die zweite meist längs in beiden Tochterzellen. Die Ebenen dieser zweiten Längswände sind entweder gleichgestellt oder kreuzen sich im Winkel von 90° zu einander. Durch folgende Teilungen entsteht schliesslich einschichtig das den Embryo umgebende 10–15–zellige Endosperm (Fig. 31, c).

Die Entwicklung des Endosperms geht der des Embryos voran. Jeder Kern des Embryos trägt zwei (ein grosses und ein kleines) Kernkörperchen, der des Endosperms trägt deren drei. Bei der Kernteilung des Endosperms konnte ich 60 Chromosomen beobachten (Fig. 31, M).

Abgesehen von der folgenden Veränderung des Integuments, d.i. Verdickung der Zellwände der äusseren Schicht und Zugrundgehen der inneren Schicht, ist der Umriss der Samen schon etwa einen Monat nach der Bestäubung vollkommen geworden.

Im Gegensatz zu *Mitrastemon* brauchen die Pollenschläuche von *Cytinus Hypocistis* nur etwa 10 Stunden, um von der Narbe bis in die Fruchtknotenhöhle zu gelangen (nach HOFMEISTER 1858). Die Endospermbildung von *Rafflesia* (nach ERNST und SCHMID 1909, 1913) und *Pilostyles* (nach ENDRISS 1902) ist nukleär, die von *Cytinus* aber ist zweideutig. Nach ARCANGELI (1874) ist sie nukleär, und die Endospermzellen umgeben den Embryo einschichtig, während sie nach BERNARD (1902, 1903) zellulär zu sein scheint, denn etwa

zweischichtig den Embryo umgebende Endospermzellen sind stellenweise in Teilung, also nicht simultan gebildet.

XI. **Frucht und Samen.**

Bis ich im Jahre 1933 über die embryohaltigen Samen von *M. Yamamotoi* berichtete, waren der echte Samen und die reife Frucht dieser Pflanze nicht bekannt. Diese Tatsache beruht einzig auf der Seltenheit der reifen Früchte in Kiushū und Shikoku. Ich hatte aber schon 1925 die Gelegenheit, die reifen

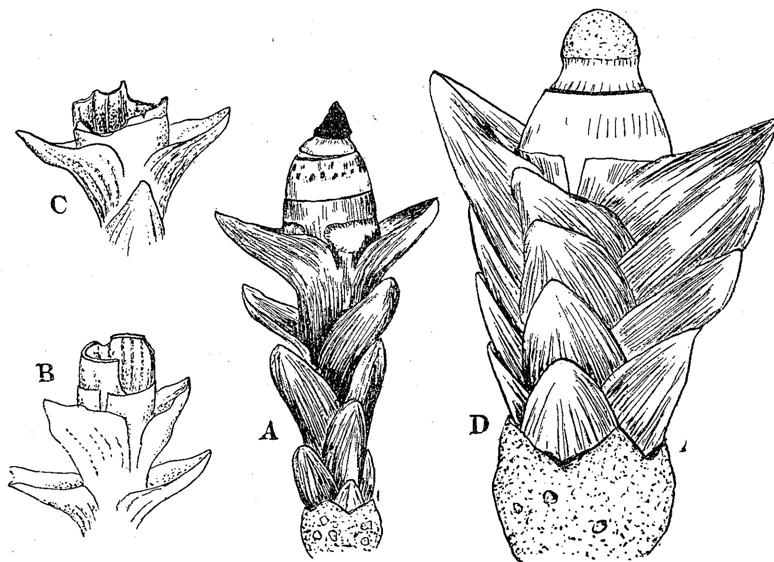


Fig. 32. ABC reife Früchte von *M. Yamamotoi*, D reife Frucht von *M. Kawa-Sasakii*: BC sind aber von Tier abgefressen. (×1).

Früchte und die embryohaltigen Samen zu finden.

Die Früchte von *M. Yamamotoi* reifen etwa von Anfang März bis Anfang April in Ōsumi, drei Monate nach der Blüte. Die meisten Gynäceen aber haben es vorher aufgegeben, sich weiter zu entwickeln, und enthalten im Frühling nur samen-ähnliche, aber embryolose Samenanlagen (Fig. 31, HI). Diese sterilen, kapselartig gewordenen Gynäceen sind die, welche vor meiner Berichte im Jahre 1933 von den Botanikern für die Früchte gehalten wurden.

Dieser Irrtum ist nicht zu verwundern, denn nach der Blüte verdicken sich alle Gynäceen, sterile und fertile, in gleicher Weise, und erst etwa zwei

Monate später kommt die Verschiedenheit zutage. Überdies sind die fertilen Früchte sehr selten in nördlichen, leicht zugänglichen Fundorten.

Die reife Frucht ist von ellipsoidischer Form und von 2 cm Länge, 1.2 cm Breite, also etwa zweifach grösser als der Fruchtknoten in der Blütezeit(Fig. 32, A; Fig. 33; Taf. II, B). Die Aussenwand der reifen Frucht ist orangerosa und hat hornige Beschaffenheit. Auf den plattenförmigen Placenten sind zahlreiche, mikroskopisch kleine, gelbe Samen befindlich. Diese Frucht ist eine süsse Beere.

Die Fruchtwand nimmt erheblich an Durchmesser zu, aber der Griffel wächst nicht in gleichem Schritt mit ihm, sodass zur Zeit der Fruchtreife der obere Rand der Fruchtwand etwas über die Griffelbasis seitlich vorragt, und schliesslich entsteht ein Querriss zwischen Griffel und Fruchtwand an dem Gliedring. Dieser Öffnungsmechanismus ist besonders leicht verständlich bei *M. Kawa-Sasakii* (Fig. 32, D), weil diese Art eine grössere Frucht als *M. Yamamotoi* hat. Solcher abgerissene Deckel, d.i. Griffel und Narbe, wird durch die quellende Inhaltsmasse der Frucht, d.i. Samen und Placentengewebe, aufgehoben. Dies kommt besonders an den Regentagen auffällig zum Vorschein.



Fig. 33. *M. Yamamotoi* in Fruchtzeit: die im Zentrum eine reife Frucht mit aufgehobenem Deckel, andere dagegen sterile Fruchtknoten.

Das sterile Gynäceum, welches bekanntlich etwas kleiner als die fertile Frucht ist, wird dunkelbraun im März und April (Taf. II, D). Der Griffel dieses sterilen Gynäceums bleibt an den Fruchtknoten fest anhaftend, weil die Wachstumsdifferenz zwischen diesen zwei Teilen fehlen und somit die Gewebesverschiebung nicht stattfindet. Auch die Trockenheit des Inhaltes

trägt zu der Befestigung des Griffels noch etwas bei. Auf diesem trockenen Griffel und Fruchtknoten sind seichte Längsfurchen zu finden. Die MAKINOsche Diagnose : „Fruit baccate, indehiscent (?) slightly larger than the ovary, often longitudinally sulcato-striate on the surface" spricht mit grosser Wahrscheinlichkeit von dem sterilen Gynäceum, das noch nicht aufgetrocknet ist. Taf. II, B und D zeigen den Unterschied zwischen der fertilen Frucht und dem sterilen Gynäceum im Frühling.

Ich hatte die pulverähnlichen Samen von reifen Früchten mittels der CARNOYsche Fixierungsflüssigkeit behandelt, dann liess ich sie in Zelloidin eingebettet und auf dem Mikrotom geschnitten. Auf diesen Schnitte konnte ich erst dem inneren Bau der Samen genau studieren.

Bei dem gewöhnlichen Paraffin-Verfahren fallen die Samenschalen in Stücke, wenn die auf dem Objektträger angeklebten Schnitte mittels Xylol von Paraffin befreit werden, weil die stark verholzten Samenschalen beim Schneiden zertrümmert sind.

In dem embryohaltigen Samen (Fig. 31, FG) verdicken sich die radialen und inneren Zellmembranen von der äusseren Zellschicht des Integuments erheblich, und färben sich rötlichbraun. Diese Schicht stellt die einzige Samenschale dar, und zeigt auch die Holzreaktion. In den Zellen dieser Samenschale finden wir auch rötlichbraune Klümpchen, welche seit dem Stadium der Samenanlage dort befindlich sind.

Die inneren Zellschicht des Integuments ist durch dem Druck des Endosperms zugrundgegangen, ausgenommen die Region um die Mikropyle ; die Reste dieser zertrümmerten Zellen sind zwischen Endosperm und Samenschale zu finden.

Die Anordnung der Zellen des Endosperms und Embryos ist wie schon erwähnt: der Embryo besteht aus 4 Zellen, von denen zwei mikropylare übereinander, zwei chalazale nebeneinander liegen ; das Endosperm besteht aus 10–15 Zellen, die einschichtig den Embryo umgeben. Die Zellen des Embryos sowie des Endosperms enthalten in frischem Zustand viele Tropfen von ölartigem Stoffe, der sich bei der Behandlung mit Xylol auflöst (Fig. 34, CDg).

Die sterilen Samenanlagen sowie die embryohaltigen Samen sind eiförmig, und messen gleichfalls 0.2 mm Breite bei 0.3 mm Länge : der Samen entwik-

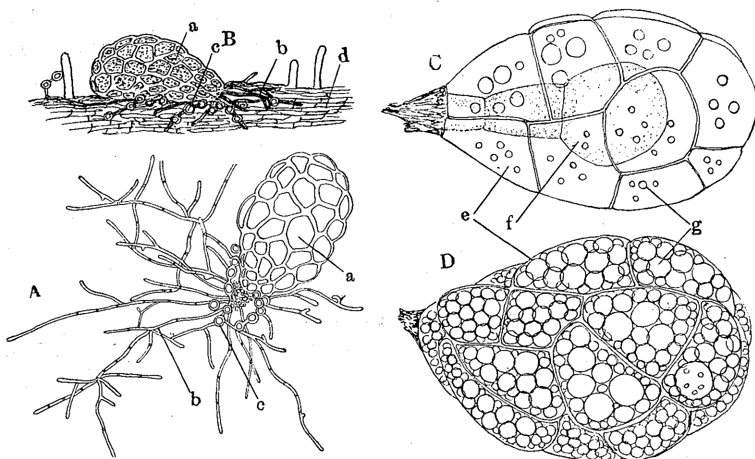


Fig. 34. Samen von *M. Yamamotoi*. AB Keimung von *Mitrastemon*-Pilz aus Mikropyle bei Aussaat der Samen, und zwar A auf Agarboden, B auf *Shiia*-Wurzel, CD frische Endospermen, welche durch Zerreibung von *Mitrastemon*-Samen zwischen zwei Objektträgern aus den Samenschalen entnommen wurden. a Samen, b Hyphen von *Mitrastemon*-Pilz, c Chlamydosporen desselben, d *Shiia*-Wurzel, e Endospermzellen, f Embryo, g Öltropfen. (AB×70, CD×300)

kelt sich nicht über den Zustand der Samenanlage in Bezug auf die Grösse. Sélbst in der fertilen Frucht sind sterile Samenanlagen nicht selten beigemengt, doch kann man durch genauere Beobachtung die Samen und die Samenanlagen unschwer voneinander unterscheiden, denn die Samenschale ist rötlichbraun, die entsprechende Schicht der Samenanlage gelb.

Vergleicht man den Samen von *Mitrastemon* mit denen der übrigen Rafflesiaceen, dann ergibt sich eine merkwürdige Übereinstimmung :

Die Zellen der Embryonen von *Rafflesia* (nach R. BROWN 1845, SOLMS-LAUBACH 1874 b, 1898, ERNST und SCHMID 1909, 1913), *Pilostyles* (nach SOLMS-LAUBACH 1874 b, ENDRISS 1902) und *Cytinus* (nach ARCANGELI 1874, SOLMS-LAUBACH 1874 b, BERNARD 1902, 1903) orduen sich in den Längsaxen der Samen in 5–7 Stockwerken, jedes Stockwerk aber besteht in den höchsten Fällen (bei *Rafflesia*) aus 5 Zellen, meistens aber aus 1–2 Zellen. Wenn VAUCHER (1841) auch fälschlich über *Cytinus* „1′ embryon droit et dicotylé“ sprach, sind in der Tat keine Kotyledonen in Rafflesiaceen vorhanden. Obgleich bei diesen

drei Gattungen Nucelluszellen in vervollkommneten Samenanlagen noch vorhanden sind, gehen sie nach der Endospermbildung stets zugrunde. Die Zellwände der äusseren Schicht vom inneren Integument verdicken sich und werden zu der Samenschale. Das äussere Integument von *Rafflesia* gestaltet sich an der chalazalen Region als ein Buckel, dasjenige von *Pilostyles ingæ* bildet einen einschichtigen parenchymatischen Überzug der Samenschale, das von *Cytinus Hypocistis* bleibt in der Form einiger Läppchen an dem Funiculus und endlich das von *Cytinus Baroni* fehlt gänzlich (nach ARCANGELI 1874, BAILLON 1888, BAKER 1888, BERNARD 1903, R. BROWN 1845, ENDRISS 1902, HOFMEISTER 1859, SOLMS-LAUBACH 1974 b).

Der Samen, besonders der Embryo von *Mitrastemon* ist der einfachste der Rafflesiaceen.

Eigentümlich ist die Anwesenheit von einem Pilz in den meisten, mehr oder weniger geöffneten reifen Früchten. Dieser Pilz, den ich vorläufig den *Mitrastemon*-Pilz nennen will, bildet eigentümliche Chlamydosporen wie Fig. 31, FHj. Im April 1932 konnte ich in allen 28 reifen Früchien aus Kōyama den *Mitrastemon*-Pilz nachweisen. Diesen Pilz mit Chlamydosporen fand ich auch in der Mehrzahl der Samen in der Mikropyle oder um die Aussenmünde der Mikropyle angehäuft. Diesen Pilz konnte ich auch in den Früchten von *M. Kanehirai* aus Formosa nachweisen.

In den sterilen Gynäceen konnte ich verschiedene andere Pilze reichlich finden, aber die Chlamydosporen des *Mitrastemon*-Pilzes nicht.

Wie später erörtert wird, ist der *Mitrastemon*-Pilz vielleicht mit dem im Honig der Blattbasen befindlichen hefe-artigen Pilz identisch, denn ich fand einerseits im Honig gelegentlich chlamydosporen-tragende Fäden in Gesellschaft mit den Hefeformen, und andererseits in den Früchten gelegentlich auch die Hefeformen. Dies wurde noch durch den Kulturversuch des *Mitrastemon*-Pilzes bestätigt.

Vermutlich dringt dieser Pilz mit der Aufhebung des Fruchtdeckels in die Frucht ein, und verhindert dort die Vermehrung anderer Pilze in Konkurrenz, durch Absonderung irgend eines Stoffs. Dies ist annehmbar, da die so süsse Flüssigkeit in den Blattbasen selten von einem anderem Pilz besiedelt wird, als dem hefeartigen *Mitrastemon*-Pilz.

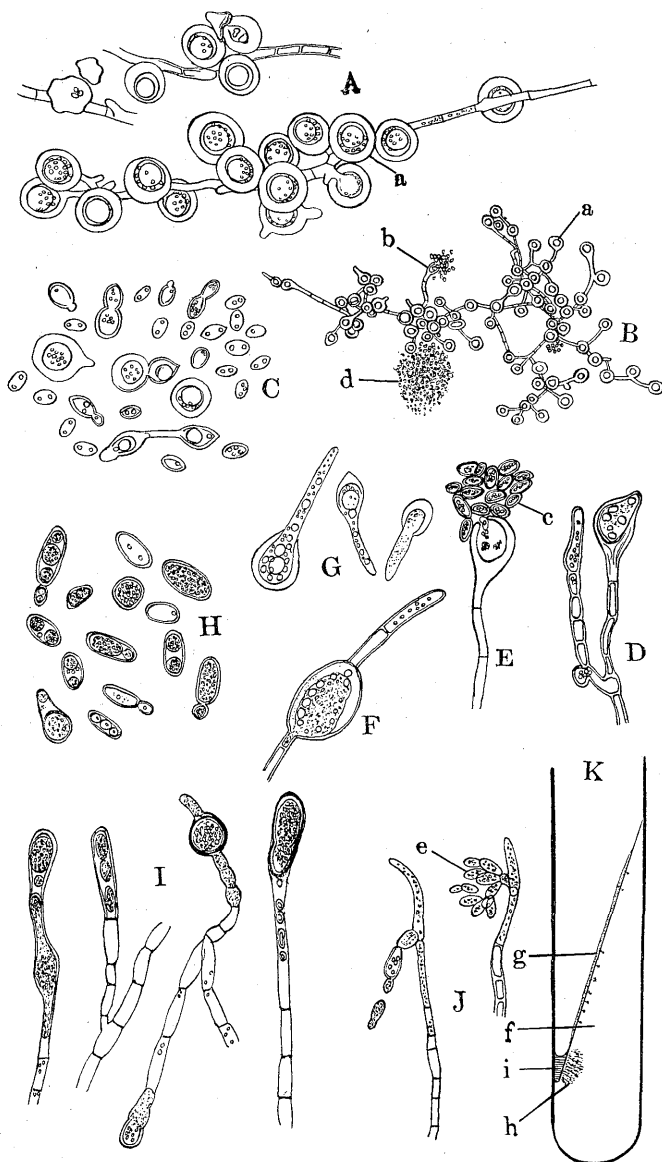


Fig. 35. *Mitrastemon*-Pilz in Kultur. Alles auf Glucose-Agar ausgenommen HI. A Hyphen mit Chlamydosporen, B Hyphen mit Chlamydosporen, Oidien und Endosporen, C Oidfen, DEF Endosporen bildung, G Keimung von Oidien, HI Oidienund Hyphen auf dem Boden nach GORODKOWA, J OidienBildung, K Strichkultur auf schräger Fläche. a Chlamydospore, b Endosporenbildung wie E, c Endospore, d, e Oidien, f Agarboden. g Mycelium auf Agarboden, h Hyphen mit Chlamydosporen in Agar, i Kondenswasser. (A, C, D-J ×400; B×80; K×2/3)

Auch konnte ich an den Resten von Früchten (Fig. 32, BC), die von Tieren gefressen sind, die Reifezustände jener Früchte beurteilen, indem ich mich der Anwesenheit der Chlamydosporen des *Mitsastemon*-Pilzes als eines Zeichens der Fruchtreife bedienen konnte.

Der *Mitrastemon*-Pilz hat folgende Eigenschaften(Vergl. Fig. 35): Hyphe 3 μ breit, mit Querwänden ; Chlamydosporen 14 μ Durchmesser, deren Membran 3 μ dick, und in dem Inneren ein grosser (Durchmesser 8 μ) und einige kleinere Öltropfen. Auf Agarboden (2% Agar mit 3% Glucose) bildet er weissliche, strahlige Kolonien (Fig. 36), deren Durchmesser bis 1 cm erreicht. Auf diesem Boden bildet er ausser Chlamydosporen auch elliptischen Oidien (ca. $4 \times 6 \mu$ dick) und Endosporen. Dieser Pilz wird etwas anærob bei der Clamydosporenbildung, sodass diese Sporen nicht auf, sondern in dem Agarboden entstehen. Bei Strichkultur wird die Chlamydosporenbildung besonders reichlich an der niederen Stelle, wo die Bodenfläche durch das Kondenswasser luftarm wird (Fig. 35, Kh). Aber selbst auf dem Agarboden nach GORODKOWA bildet dieser Pilz diejenigen Sporen, welche der Artbestimmung Anhalt geben, nicht.

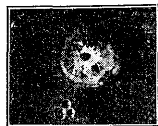


Fig. 36. Kolonie von *Mitrastemon*-Pilz auf Agarboden (× 1)

Als die Angabe von Pilz in anderen Rafflesiaceen finde ich nur die von BLUME (1828) über einem Pilz, dessen Sporen (Chlamydosporen!) an dem Samen von *Rhizanthes* (=*Brugmansia*) anheftet sind. Ob dieser Pilz in *Rhizanthes* mit dem *Mitrastemon*-Pilz identisch ist, kann ich noch nicht entscheiden.

XII. **Samenverbreitung.**

Wegen häufiger Regengüsse in den *Mitrastemon*-Habitaten habe ich häufig solche reifen Früchte angetroffen, deren Griffel durch dem Regen abgestossen und die Samen ausgeflossen sind. Auf diese Weise können die Samen etwas verbreitet werden.

Häufiger, und zwar in jedem Frühling, fand ich, dass die Griffel entfernt werden und der Inhalt der Früchte bis zum Fruchtboden abgelassen ist. Um aus dieser tonnenförmigen Frucht den Inhalt auszufressen, ist ein etwa schnabelartiger Mund erforderlich. Auch konnte ich mit schnabelartig zuge-

spitztem Objekte gepickte Reste der Früchte wahrnehmen. Obgleich ich noch nicht den Fressakt gegenwärtigen konnte, schliesse ich doch aus dem süssem Geschmack der Früchte und den oben erwähnten Resten der Früchte, dass Vögel das wahrscheinlichste Moment für die Verbreitung der Samen sind. Gelegentlich fand ich auch solche Früchte, deren Fruchtwände abgefressen worden sind (Fig. 32, BC). Dies wurde vielleicht von Mäusen getan.

Sämtliche extramatricalen Teile in der Blütezeit, sowie der Stengel in der Fruchtzeit sind sehr adstringierend von Geschmack, sodass kein Tier sie angreift: die Tiere fressen nur die süssen reifen Früchte.

Etwa vom 10. April an, werden alle reifen Früchte weggefressen, sodass nur die sterilen vertrockneten Gynäceen (Taf. II, D) und leer gewordenen Fruchtwände (Taf. II, C) zurück bleiben.

Um die Widerstandsfähigkeit der Samenschale zu prüfen, liess ich die frischen Samen einen gezähmten *Zosterops palpebrosa* und einen Kanarienvogel fressen, und konnte bestätigen, dass durch die Durchfahrt durch den Darmkanal die Samen nicht beschädigt werden.

Über die Verbreitung der Samen der übrigen Rafflesiaceen wissen wir die Angaben von ERNST und SCHMID(1913), JUSTESEN (1922) und WINKLER (1927) über *Rafflesia*, die von ASCHERSON (1864) und TROTTER (1900) über *Cytinus*.

Ernst und SCHMID berichteten über *Rafflesia*, dass die Samen frei werden, wenn die reife Frucht vermodert oder zertreten wird, und dass ihre Verbreitung in der Hauptsache durch Tiere erfolgt, an deren Füssen der samenhaltige Fruchtbrei hangen bleibt. JUSTESEN war auch dieser Meinung, und bot viele Beispiele des häufigen Vorkommens von *Rafflesia* an Forstteilen, die den Menschen-Wohnungen nahe stehen. WINKLER äusserte ausser einer dieser ähnlichen Meinung auch, dass bis zu einem gewissen Grade übrigens auch das Wasser an der Samenverbreitung beteiligen sein muss. ASCHERSON schloss die Übertragung von *Cytinus*-Samen durch Vögel, aber nach TROTTER sei sie durch Ameisen durchgeführt.

Es ist nicht zu leugnen, dass *Mitrastemon* gelegentlich durch die Menschenfüsse verbreitet wird, weil diese Pflanzen nicht selten entlang den Forst-Pässen befindlich sind.